高效能植酸酵素在增進土壤有機磷及有機質肥料有效性之應用

張明暉、楊秋忠

行政院農業委員會農業試驗所農業化學系、國立中興大學土壤環境科學系

一、前　言

植酸鹽(phytate)爲穀類及豆科作物植株中磷素主要貯藏形式，此類作物爲人類及動物主要營養素，唯植酸鹽無法爲缺乏植酸酵素(phytase)之單胃動物分解，如豬、家禽、魚類無法代謝植酸鹽，致使必須另外添加無機磷於飼料中以滿足所需，結果密集式畜牧業往往造成環境中磷污染；另植酸鹽易束縛鈣、鎂、鐵、錳、銅、鉬、鋅以及蛋白質，爲抗營養劑，因此以植酸酵素作爲動物飼料添加物，可以提高動物對有機磷利用率及減少環境中磷污染。而目前植酸酵素已有商品化產品上市。

鑑於近年來利用生物計技術生產高效能植酸酵素作爲動物飼料添加物之可行性，而土壤有機磷約佔全磷量 30-50%，甚至高達 80%，其主要爲植酸鹽，約佔 10-15%，亦必需藉由植酸酵素水解作用，方能釋出無機磷供作物吸收利用；除此之外，有機質肥料之原始材料來源，多取自豬、家禽糞便，該類有機肥富含植酸鹽，如雞糞植酸鹽含量約 1610-3510 $\mu g\ g^{-1}$。因此，透過基因選殖操作技術，利用改良之遺傳工程菌株，當可增進土壤或有機質肥料之有機磷有效性。

二、植酸酵素之回顧介紹

1907 年 Suzuki 等人首次在米糠中發現植酸酵素(phytase 或

myo-inositol-hexaphosphate phosphohydrolase)，1962 年美國 International Minerals and Chemicals (IMC) 開始著手研發植酸酵素商品化產品，其後至 1979 年代雖陸續分離發現優良菌株，該酵素產量爲前所未及，如 *Aspergillus niger* NRRL 3135 syn *A. ficuum*。而直至目前基因選殖操作之植酸酵素基因有兩個，大多分離自該種菌株，分別爲 phy A 和 phy B，其酵素活性最適合之酸鹼值，phy A 爲 pH5.5 和 2.5，phy B 爲 pH2.0。1971 年 Nelson 等人曾以植酸酵素爲飼料添加物，可惜植酸酵素產量不高，不符經濟原則。直至 1980 年代，隨著基因選殖操作許可，產量明顯增加。荷蘭 Gist-brocades 和芬蘭 Alko Ltd 同時於 1987 年投入商品化植酸酵素研發。1991 年，Gist-brocades 選殖 phy A，並結合 amyloglucosidase 啓動子於 *A. niger* NRRL 3135，酵素產量比原野生種增加約 52 倍，目前該商品化植酸酵素已廣泛使用於家禽、豬之飼料添加物，且在許多國家核准上市(包括台灣)，其在台灣上市之植酸酵素售價每公斤九百元。而美國亦於 1996 年一月核准植酸酵素爲食品添加物上市。

含植酸鹽之有機磷可經由植酸酵素水解作用，釋出無機磷以供植物吸收利用，其構造及反應式如圖一所示。植酸鹽爲穀類及豆科作物植株中磷素主要貯藏形式。此類作物爲人類及動物主要營養素，唯單胃動物缺乏磷酸酵素，如豬、家禽、魚類無法代謝植酸鹽，致使必須另外添加無機磷於飼料中以滿足所需，結果往往造成密集式畜牧業環境中磷污染；另植酸鹽易束縛鈣、鎂、鐵、錳、銅、鉬、鋅以及蛋白質，爲抗營養劑(Janne kerovuo et al., 1998)，因此以植酸脫磷酵素作爲動物飼料添加物，可以提高動物對有機磷利用率及減少環境中磷污染。根據美國農業 1993 年統計估算，美國地區飼養之單胃動物，每年若於飼料中添加植酸酵素，則由植酸鹽水解釋出的磷素約 $1.68*10^8$ 美元。除此，可以減少 $8.23*10^7$ kg 磷素排放至環境中。而目前植酸脫磷酵素已有商品化產品。

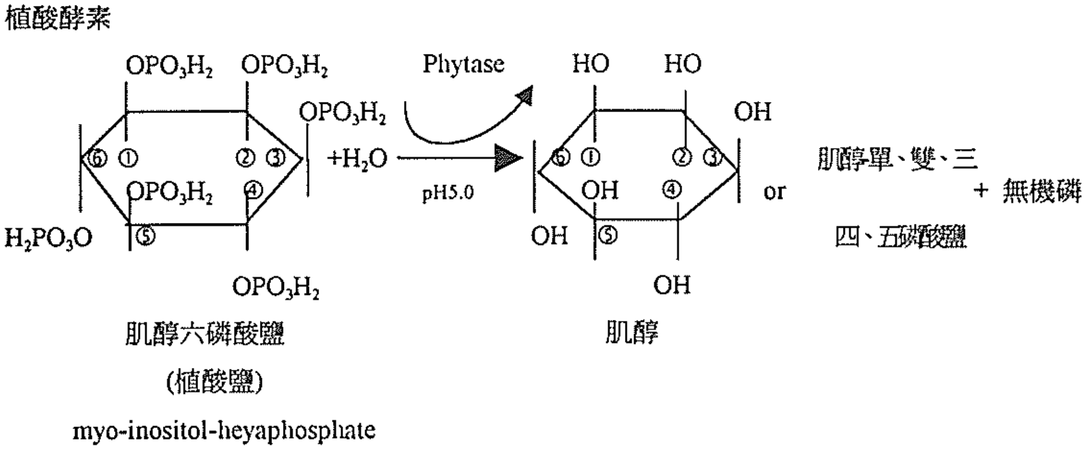

圖 1. 植酸鹽經由植酸酵素之水解反應
Source:Bing-Lan Liu, 1998

植酸酵素的來源如表一所示，(1).植物性來源：穀類、豆科以及某些種子及花粉富含該酵素。(2).動物性來源：該酵素存在脊椎動物紅血球及血漿中以及哺乳動物小腸中。(3).微生物：可分爲細菌與真菌，細菌諸如 *Aerobacter aerogenes* (Greaves et al.,1967)，*Bacillus subtilis* (Shimizu,1992)，*Pseudomonas* sp.(Cosgrove,1970)；真菌如 *Aspergillus spp.* (Ullah and Gibson ,1987)以及酵母菌(Greenwood and Lewis 1977)。一般由真菌產生之植酸酵素爲胞外酵素，而由細菌產生者，除了 *Bacillus subtilis* 和 *Enterobacter* 爲胞外酵素，一般爲胞內酵素(Liu et al., 1998)。植物雖亦可生產植酸酵素，目前亦有轉基因植物作爲飼料添加物，但費時且不易量產，故一般以微生物來生產(曾，1998)。而隨著基因選殖操作許可，植酸酵素產量明顯增加。

表一、植酸酵素之來源與特性

種類	來源	分子量(kDa)	適當溫度(℃)	適當 pH
細菌	*B. subtilis*	36-38	60	6.0-6.5(6.25)
	E. coli	42	55	4.5
	Enterobacter	-	50	7.0-7.5
	K. aerogenes	10-13,700	60-70	4.5,5.2(3.7)
	Pseudomonas	-	-	5.5
真菌	*A. ficuum*	85-100	55-60	4-6(4.5)
	A. niger	200	53	5.5
	A. terreus	214	70	4.5
	A. oryzae	120-140	50	5.5(4.5)
	R. oligosporus	-	55	4.5
酵母菌	*S. casterllii*	490	77	4.4
	Bakers' yeast	-	45	4.6
植物	油菜籽	-	50	5.2
	南瓜	66.5	48	4.8
	麝香百合	88	55	8.0
	玉米	76	55	4.8
	綠豆	160	57	7.5
	大豆	60	55	4.5-4.8(5.5)
	小麥	68	45	6.0
	麥麩	47	55	5.0-5.6,7.0
動物(腸黏液)	人類	-	-	7.4
	雞	-	-	8.2
	小牛	-	-	8.7
	老鼠	70-90	-	7.0,7.5-7.8

Source：Bing-Lan Liu et.al., 1998

三、土壤有機磷之性質

土壤有機磷含量約佔全磷量 30-50% (Paul and Clark, 1989)，甚至高達 80% 。土壤有機磷含量明顯受母岩影響，一般石灰性土壤、沖積土以及湖中黏土含量低，而玄武岩、火山灰、鹼性火成岩較高；而黏土之有機磷含量高於粗質地土壤，但較腐植質土壤低；另有機磷多以大分子化合物存在，主要與黃酸(fulvic acids)結合，其次與腐植酸(fumic acids)，而腐植素(humins)幾乎不含磷素。Walker and Adams(1959)研究結果顯示:有機磷含量隨降雨量及平均溫度增加而減少。其他影響土壤有機磷含量之因子包括：排水、土壤酸鹼度、耕犁情形等。排水不良土壤，有機磷含量較少；土壤有機磷含量一般隨土

壤酸鹼度減少而增加，隨耕犁操作而減少。

土壤有機磷一般區分爲三大類，即肌醇磷酸鹽(inositol phosphates)、磷脂質(phospholipids)、核酸(nucleic acids)，如表二所示，其主要爲肌醇磷酸鹽，該分子可能與碳水化合物或蛋白質形成複合物，主構造可能含有六、五、四、三、二個磷酸，依植酸酵素水解程度而定，而土壤中以含有六、五個磷酸佔大多數，其它較低分子者很少。其中含有六個磷酸之肌醇磷酸鹽，稱之植酸鹽(phytate 或 phytic acid 或 myo-inositol hexaphosphate)，其若含有鈣－鎂則通稱爲植酸鈣鎂(phytin)。植酸鹽爲主要之土壤有機磷，約佔 10-15% (Islam and Ahmed, 1973)。植酸鹽爲磷酸酯化合物，主要爲正磷酸單酯。且長期試驗施用過磷酸鈣，土壤有機磷多以正磷酸單酯聚積(Condron et al., 1985)。

表二、土壤有機磷種類之分佈比例

土壤來源	有機磷%		
	肌醇磷酸鹽	磷脂質	核酸
澳洲	0.4-38	-	-
孟加拉	9-83	0.5-7.0	0.2-2.3
英國	24-58	0.6-0.9	0.6-2.4
加拿大	11-23	0.9-2.2	-
紐西蘭	5-43	0.7-3.1	-
奈及利亞	23-30	-	-
美國	3-52	-	0.2-1.8

Source：Dalal, 1977

四、利用遺傳工程菌株增進土壤有機磷之有效性

磷爲肥料三要素，爲農業作物生產之必需營養素，其來自礦石開採，終有用盡耗竭之日，故爲達農業永續性，如何增進土壤有機磷有效性有其重要性。耕作土壤雖經長年大量施磷肥，但多爲土壤固定累積，致使土壤中磷之有效性甚低，不易被作物吸收利用。一般磷肥施入一年生作物土壤，回收之磷素不超過 20%(楊，1993)，此被土壤固定的磷素就如同存放在銀行的貨幣，若未經提領使用，即無法發揮效用。而土壤有機磷有效性之增進有賴磷酸酵素(phosphatase)水解作用

釋出無機磷以供植物利用。一般凡能催化磷酸酯水解反應之酵素通稱爲磷酸酵素，文中提及之「植酸酵素」係磷酸酵素的一種，其名稱係根據酵素對基質專一性之特性。

台灣土壤中究竟含有多少有機磷？根據馬氏 1978 分析資料，一般土壤無機磷含量高於有機磷，但部分酸性土壤有機磷含量高於無機磷，且一般酸性土壤有機磷含量高於石灰性土壤，如表三所示。而根據台灣農業年報 1994 年統計，近十年來台灣農民每年過磷酸鈣施用量約 20 萬公噸，如此多量之無機磷素部份可能形成有機磷累積，需賴微生物或植物之磷酸酵素水解作用，方能供作物吸收利用；而穀類、豆科作物廣佈於世界各地，提供人類及動物養分主要來源，植酸鹽爲其重要儲存形態，若能利用植酸酵素將之水解出無機磷，必能增加土壤磷素地力進而達永續利用之目的；除此，今日農民對有機肥料施用的觀念已極爲普遍，而有機肥之原始材料大多來自豬、家禽糞便，此廢物之植酸鹽含量頗高，如雞糞含量約 1610-3510ug g^{-1} (Peperzak et al., 1959)，若能藉由植酸酵素水解作用釋出無機磷以供植物吸收利用，不但可以提升該類有機質肥料的品質，並可減輕該廢棄物造成環境污染的問題。

表三、 台灣地區土壤有機磷、無機磷含量

土壤	土系	土類	有機磷	無機磷	植生
			--------ug g^{-1}	---------	
1	龍崗系	紅壞	181	361	水稻
2	龜山系	紅壤	88	75	水稻
3	平鎮系	紅壤	139	100	茶樹
4	陳厝寮系	紅壤	117	161	甘蔗
5	老埤系	紅壤	365	273	鳳梨
6	淡水系	紅壤	232	144	芒草
7	二林系	粘板岩老沖積土	117	631	水稻
8	二水系	粘板岩老沖積土	120	948	水稻
9	善化系	台灣粘土	115	493	水稻
10	麻豆系	砂頁岩新沖積土	110	752	甘蔗
11	座駕系	砂頁岩非石灰性新沖積土	126	257	水稻
12	花壇系	粘板岩新沖積土	220	583	水稻
13	五魁寮系	粘板岩老沖積土	218	423	蓮霧、檳榔

資料整理自馬清華，1978

1997 年 Richardson 等人從土壤篩選獲得之螢光性 *Pseudomonas spp* (*P. mendocina* CCAR31 和 CCAR60)具分泌植酸酵素的能力，且其從植酸鹽釋出之無機磷高達 81%。近日，隨著分子生物學基因調控操作技術之進步，以遺傳工程菌株增進土壤有機肥料中有機磷之有效性當爲可行。

五、結語

土壤中磷素有效性低，主要的原因在於土壤中磷素大多被固定累積且不易移動，故農民每年雖施用大量磷肥，但植物吸收量不及 20%，其餘多爲土壤固定累積。故如何增進土壤中磷素有效性，過去即引起廣泛研究，不過多偏重土壤無機磷方面。然依本文中所述，土壤有機磷在磷循環亦扮演著重要角色，故如何增進土壤有機磷有效性？當爲未來的研究方向。而政府自八十四年起積極發展有機農業，有機農業爲永續農業之一環，在施肥管理方面，倡導不施化學肥料或減少化學肥料使用，以有機質肥料取代化學肥料。此觀念當爲日後作物栽培施肥管理之趨勢，蓋有機質肥料不但可以避免化學肥料對土壤之負面影響，更可解決本省大量農牧廢棄物所造成環境嚴重污染問題，並達資源再利用的目的。除此，水旱田輪作制度亦爲土壤地力增進之重要對策，而穀類、豆科爲常見之輪作作物，此類作物含豐富植酸鹽，可提供土壤部份有機磷，唯需賴植酸酵素水解作用釋出無機磷。因此我們期能隨著分子生物學之進步，以基因選殖操作技術，利用改良之遺傳工程菌株，研發生物肥料取代部份化學肥料施用，以增進土壤或有機質肥料之有效性。使得有機質肥料合理化施用技術更臻完善。

六、參考文獻

1.台灣農業年報。 1994。台灣省政府農林廳。

2.馬清華。1989。台灣土壤磷模式基礎資料之建立。國立台灣大學農

業化學研究所碩士論文。

3.曾雅秀、方繼。1998 *pencillium simplicissimum* W46 胞外植酸酉每之生產、純化及特性分析。中國農業化學會誌 36:598-611。

4.楊秋忠。1993。土壤與肥料(第五版)。農世股份有限公司，台中。

5.Cosgrove, D.J. 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbial origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. Aust. J. Biol. Sci. 23:1207-1220.

6.Condron, L. M., K. M. Goh, and R. H. Newman. 1985. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ^{31}P nuclear magnetic resonance analysis. J. Soil Sci. 36:199-207.

7.Dalal, R. C. 1977. Soil organic phosphorus. Adv. Agron. 29:83-117.

8.Greaves, M.P., Anderson, G., and Webley, D.M. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. Biochem. Biophys. Acta, 132:412-418.

9. Greenwood, A. J., and Lewis, D. H. 1997. Phosphatase and the utilisation of inositol phosphate by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta,132: 412-418

10. Harrison A. F. 1987. Soil organic phosphorus. C.A.B International.

11.Islam, A. and B. Ahmed, 1973. Distribution of inositol phosphate, phospholipids and nucleic acids and mineralization of phosphates in some Bangladesh. J. Soil Sci. 24:193-198.

12.Janne kerovuo, Marko Lauraeus, Paivi Nurminen, Nisse Kalkkinen, and Juha Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, And sequencing of novel phytase from *bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology 64(6):2079-2085.

13.Liu, B. L., Amjad Rafig., Yew-Min Tzeng, and Abdul Rob 1998 The induction and characterization of phytase and beyond. Enzyme and Microbial Technology 22:415- 424.

14.Peperzak, P., A. G. Galdwell, R. R. Hunziker and Black, C. A. 1959. Phosphorus fractions in manures. Soil Sci. 87: 293-302.

15.Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, New York. P.222-232.

16.Richardson, A.E., and P. A. Hadobas.1997. Soil isolates of *pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphate. Can. J. Microbiol. 43 : 509-516.

17. Stewart B. A. 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil. Springer-Verlag New York Inc.16.

18.Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Biosci. Biotechnol. Bio-chem. 58:1266-1269.

19. Ullah, A. H., and D. M. Gibson. 1987. Extracellular phytase (E.C.3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3155: Purication and characterization. Prep. Biochem .17:63-91.

20. Ullah, A. H., and R. J. Wodzinski. 1996. Phytase. Adv. Appl. Microbiol. 42 : 263-302